



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto  
is a true copy from the records of the Korean Intellectual  
Property Office.

출원번호 : 10-2003-0062756  
Application Number

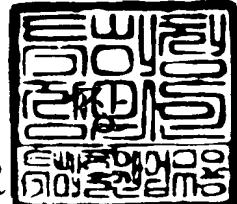
출원년월일 : 2003년 09월 08일  
Date of Application SEP 08, 2003

출원인 : 한국과학기술원  
Applicant(s) Korea Advanced Institute of Science and Technology

2004 년 02 월 05 일

특 허 청

COMMISSIONER



## 【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2003.09.08
【발명의 명칭】	작은 열 충격 단백질을 함유하는 단백질 분해 방지용 조성물 및 이를 이용한 이차원 전기영동법
【발명의 영문명칭】	Composition for Protecting Proteins Degradation Comprising Small Heat Shock Proteins(sHSPs) and Method of Two-Dimensional Gel Electrophoresis Using the sHSPs
【출원인】	
【명칭】	한국과학기술원
【출원인코드】	3-1998-098866-1
【대리인】	
【성명】	이처영
【대리인코드】	9-2003-000118-9
【포괄위임등록번호】	2003-015686-1
【발명자】	
【성명의 국문표기】	이상엽
【성명의 영문표기】	LEE,SANG YUP
【주민등록번호】	640412-1025515
【우편번호】	305-761
【주소】	대전광역시 유성구 전민동 엑스포아파트 212-707
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	한미정
【성명의 영문표기】	HAN,MEE JUNG
【주민등록번호】	750220-2817339
【우편번호】	305-338
【주소】	대전광역시 유성구 구성동 373-1
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	박시재
【성명의 영문표기】	PARK,SI JAE

【주민등록번호】 750202-1017714  
【우편번호】 138-873  
【주소】 서울특별시 송파구 풍납1동 149-31  
【국적】 KR  
【심사청구】 청구  
【핵산영기 및 아미노산 서열목록】  
【서열개수】 8  
【서열목록의 전자파일】 첨부  
【취지】 특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사 를 청구합니다. 대리인 이처영 (인)  
【수수료】  
【기본출원료】 20 면 29,000 원  
【가산출원료】 18 면 18,000 원  
【우선권주장료】 0 건 0 원  
【심사청구료】 17 항 653,000 원  
【합계】 700,000 원  
【감면사유】 정부출연연구기관  
【감면후 수수료】 350,000 원  
【첨부서류】 1. 요약서·명세서(도면)\_1통

**【요약서】****【요약】**

본 발명은 작은 열 충격 단백질(sHSPs)을 함유하는 단백질 분해 방지용 조성물 및 이차원 전기영동용 조성물에 관한 것이다. 또한 본 발명은 sHSPs를 이용하는 것을 특징으로 하는 개선된 이차원 전기영동(two-dimensional gel electrophoresis) 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따르면, 이차원 전기영동시 단백질 스팟(spot)이 감소되는 것을 방지하여 훨씬 많은 단백질 스팟을 포함한 이차원 전기영동 사진을 제공할 수 있다.

**【대표도】**

도 7

**【색인어】**

작은 열충격 단백질(sHSPs), IbpA, IbpB, HSP26, 이차원 전기영동, 분해 방지

### 【명세서】

#### 【발명의 명칭】

작은 열 충격 단백질을 함유하는 단백질 분해 방지용 조성을 및 이를 이용한 이차원 전기영동법 {Composition for Protecting Proteins Degradation Comprising Small Heat Shock Proteins(sHSPs) and Method of Two-Dimensional Gel Electrophoresis Using the sHSPs}

#### 【도면의 간단한 설명】

도 1은 플라스미드 pTac99IbpAH의 유전자 지도이다.

도 2는 플라스미드 pTac99IbpBH의 유전자 지도이다.

도 3은 플라스미드 pTac99<sub>PP</sub>IbpAH의 유전자 지도이다.

도 4는 플라스미드 pTac99HSP26H의 유전자 지도이다.

도 5는 각각의 재조합 플라스미드 pTac99IbpAH, pTac99IbpBH 또는 pTac99<sub>PP</sub>IbpAH, pTac99HSP26H로 형질전환된 재조합 대장균 XL1-Blue로부터 발현된 IbpA, IbpB 또는 HSP26 단백질을 정제한 전기영동 사진이다. 도 5(A)에서, 레인 M은 단백질 표준 분자량을 나타내며, 레인 1과 2는 정제된 IbpA, 레인 3과 4는 정제된 IbpB, 레인 5와 6은 정제된 <sub>PP</sub>IbpA를 나타낸다. 도 5(B)에서, 레인 M은 단백질 표준 분자량을 나타내며, 레인 1 내지 3은 정제된 HSP26을 나타낸다.

도 6은 시험관 내(*in vivo*)에서 과량의 IbpA 및/또는 IbpB에 의해 형질전환된 대장균 WIB101의 이차원 전기영동 사진이다. (A)는 대장균 WIB101(p184ΔCm), (B)는 대장균

WIB101(pACTacIbpA), (C)는 대장균 WIB101(pACTacIbpB), (D)는 대장균 WIB101(pACTacIbpAB)에 대한 이차원 전기영동 사진이다.

도 7은 정제된 각각  $10\mu\text{g}$  IbpA와 IbpB 단백질의 이차원 전기영동 사진이다. (A)와 (B)는 각각 IbpA와 IbpB의 이차원 전기영동사진이다.

도 8은 시험관 외(*in vitro*)에서 대조군과 IbpA, IbpB 또는 HSP26에 의한 대장균 W3110의 이차원 전기영동 사진이다. (A)는 대장균 W3110, (B)는 대장균 W3110에  $10\mu\text{g}$  IbpA 단백질을 첨가한 경우, (C)는 대장균 W3110에  $10\mu\text{g}$  IbpB 단백질을 첨가한 경우, (D) 대장균 W3110에 슈도모나스 유래의  $10\mu\text{g}$  IbpA 단백질을 첨가한 경우, (E) 대장균 W3110에 사카로마이시스 세레비지 유래의  $10\mu\text{g}$  HSP26 단백질을 첨가한 경우의 이차원 전기영동 사진이다.

도 9는 시험관 외(*in vitro*)에서 대조군과 IbpA에 의한 슈도모나스 퓨티다(*Pseudomonas putida*) KT2440의 이차원 전기영동 사진이다. (A)는 슈도모나스 퓨티다(*Pseudomonas putida*) KT2440, (B)는 슈도모나스 퓨티다(*Pseudomonas putida*) KT2440에 IbpA 단백질을  $10\mu\text{g}$  첨가한 경우의 이차원 전기영동 사진이다.

도 10은 시험관 외(*in vitro*)에서 대조군과 IbpA에 의한 인체 혈청(human serum)의 이차원 전기영동 사진이다. (A)는 인체 유래의 혈청, (B)는 인체 유래의 혈청에 IbpA 단백질을  $10\mu\text{g}$  첨가한 경우의 이차원 전기영동 사진이다.

**【발명의 상세한 설명】****【발명의 목적】****【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】**

<11> 발명의 분야

<12> 본 발명은 작은 열 충격 단백질(sHSPs)을 함유하는 단백질 분해 방지용 조성물 및 이차원 전기영동용 조성물에 관한 것이다. 또한 본 발명은 sHSPs를 이용하는 것을 특징으로 하는 개선된 이차원 전기영동(two-dimensional gel electrophoresis) 방법에 관한 것이다.

<13> 발명의 배경

<14> 인간 유전체에 대한 염기결정이 이루어지고 수많은 미생물, 하등 동물, 식물의 유전체 정보가 하루가 다르게 늘어 가고 있는 실정이다. 이런 와중에 차세대 연구의 화두로 떠오르는 것은 프로테오믹스(proteomics)로, 이러한 연구는 이미 선진국에서 활발히 논의되고 그에 따르는 제반 연구 장비의 개발이 급진전되고 있으며, 연구 성과가 나날이 늘어 가고 있는 실정이며 이것은 이미 학문의 범주를 넘어 산업형태로 구체화되고 있다.

<15> 프로테오믹스는 단백체(proteome)를 체계적으로 연구하는 학문영역으로 지놈(genome)을 연구하는 지노믹스(genomics)와 구별된다. 프로테옴이란 특정 조건에서 지놈(genome)으로부터 발현되는 단백질들의 종류와 양에 대한 총체적인 정보를 말한다. 이 용어는 단백질(PROTEin)과 지놈(genOME)의 합성어로 1995년에 처음 소개되었다. 결국 프로테오믹스는 생명현상에 관여하는 세포나 조직 내 여러 가지 단백질을 일시에 분석하여 동정하는 것이다. 이러한 프로테옴 분석은 지놈 프로젝트나 DNA의 연구에서 발견할 수 없는 연구 결과를 제공하기 때문에 선진국의

연구소나 대학, 그리고 국제적으로 유수한 제약회사에서 암, 당뇨병, 치매, 심장 및 순환계 질환과 같은 성인병과 정신질환 등의 진단시약이나 치료제 개발에 연구의 박차를 가하고 있으며, 또한 장기이식과 같은 분야에 응용하려고 연구하고 있다. 정상적인 프로테옴에서 벗어나는 단백질의 정체를 정확하게 알아내는 것이 프로테옴을 이용한 치료법 개발의 핵심이 된다. 즉 암, 당뇨병, 심장병 등 퇴행성 질환에 대한 프로테옴 유형을 알고 있다면 세포 내 단백질 분포를 확인하는 것으로 이러한 질병의 진단이 가능할 것이다. 그리고 약물투여나 질병에 의해 생성 또는 소멸되는 단백질의 확인을 할 수 있다면 이 결과를 질병의 진단시약 및 치료제 개발에 당장 이용할 수 있다.

<16> 현재까지 이루어지고 있는 프로테오믹스 연구에 가장 널리 이용되는 핵심 기술로는 이차원 전기영동(2-dimensional gel electrophoresis) 법이 있다. 이차원 전기영동법은 세포나 조직 내의 총체적인 단백질을 분리하고 정량화할 수 있는 가장 좋은 방법이다. 이차원 전기영동법은 단백질 혼합물을 각 단백질의 등전점(isoelectric point; pI)에 따라 일차적으로 분리하고, 전개된 시료 각각을 수직 방향으로 분자량에 따라 또 한번 분리하여 평면상에 분리된 단백질들이 이차원적인 분포를 하도록 하는 방법을 말한다. 즉 IEF(isoelectric-focusing) 방법과 SDS-PAGE(sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis) 방법을 차례로 사용하는 것이다. 현재 IEF를 이용한 이차원 젤(2-dimensional gel: 2D-gel)이 개발 되어 있으며 상용화된 기기들이 속속 출현하여 종래의 이차원 젤의 문제점인 재현성을 크게 향상 시켰다 (US 6,554,991, US 2002157954, US 2002133300, US 6,4166,44, US 6,398,932, WO 02/25259, US 2001032786, US 2001023826, US 2001015320, US 6,245,206, US 6,136,173, US 6,123,821, US 5,993,627, WO 98/59092, WO 02/90966). 또한, 이차원 젤에서 개개의 단백질들을 염색하고, 젤

라내고 단백질 분해효소로 자르고 하는 단계들이 자동화 기기와 컴퓨터를 이용해 많은 시료를 손쉽고 간단히 처리 할 수 있게 되었다.

<17> 그러나, 처음 단계인 이차원 젤 수행의 자동화가 아직도 이루어지지 않고 있다. 또한, 이차원 젤의 전 과정에서 단백질 손실(loss)이 있기 때문에 세포나 조직 내의 복잡한 프로테옴을 모두 분석하는 것은 불가능한 실정이다. 첫 번째 단계로 세포를 용해(lysis)하면 세포 내의 프로테이즈(protease)들이 나오면서 단백질이 분해(degradation)되어 전체 단백질 수가 감소하게 된다. 따라서 단백질 분리과정에서 프로테이즈의 공격을 억제하기 위한 여러 방법이 고안되었다: (1) 시료에 강한 변성제(denaturants)를 바로 첨가하는 방법; (2) 낮은 온도나 알칼리(pH 9 이상) 조건에서 시료준비; 및 (3) 프로테이즈 억제제(inhibitor)의 사용. 상기 프로테이즈 억제제로는 PMSF(phenylmethyl- sulphonyl fluoride), AEBSF(aminoethyl benzylsufonyl fluoride or Pefabloc<sup>TM</sup> SC), EDTA(ethylenediaminetetraacetic acid), Benzamidine, TLCK(tosyl lysine chloromethyl ketone), TPCK(tosyl phenylalanine chloromethyl ketone) 등이 사용되고 있다. 그러나 이러한 방법은 단백질 분해(proteolysis)를 완전히 억제시키지는 못하며, 단백질 시료의 형태와 기관이 매우 다양하기 때문에 이에 따른 최적의 시료 준비 과정을 경험적으로 결정해야 하는 실정이다.

<18> 한편, 작은 열 충격 단백질(small heat shock proteins: sHSPs)은 작은 분자량(15-30 kDa)을 가지는 열 충격 단백질들(heat shock proteins: HSPs)로 열충격이나 특정 단백질의 과잉생산과 같은 스트레스에 의해 유도되고 단백질의 변성을 보호한다. sHSPs는 진핵생물(eukaryotes)에서 원핵생물(prokaryotes)에 이르기까지 모든 생물에 하나 이상씩 존재하며 지금까지 밝혀진 sHSPs를 표 1에 나타냈었다. 이러한 sHSPs 단백질은 진화과정에서 보존된 구역

(conserved region)을 가지기 때문에 거의 유사한 기능을 수행함은 자명한 사실이다. 그러나, 이러한 sHSPs가 단백질의 분해를 방지한다는 것은 아직 알려지지 않았다.

&lt;19&gt; 【표 1】

지금까지 알려진 sHSPs.

기원 (Origin)	sHSPs
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> str. C58 (U. Washington)	IbpA
<i>Arabidopsis thaliana</i>	sHSPs
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	HspB, HspH, HspC, HspF
<i>Bacillus suis</i> 1330	IbpA
<i>Buchnera aphidicola</i> plasmid pBPS1	sHSPs
<i>Buchnera aphidicola</i> str. APS ( <i>Acyrthosiphon pisum</i> )	IbpA
<i>Citrus tristeza</i> virus	sHSPs
<i>Escherichia coli</i> CFT073	IbpA, IbpB
<i>Escherichia coli</i> K12	IbpA, IbpB
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 EDL933	IbpA, IbpB
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	IbpA, IbpB
<i>Helicobacter pylori</i> 26695	IbpB
Human	Hsp27, $\alpha$ , $\beta$ -crystallin
<i>Methanococcus jannaschii</i>	HSP16.5
<i>Methanopyrus kandleri</i> AV19	IbpA
Murine	Hsp25
<i>Mycobacterium leprae</i> strain TN	sHSPs
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Hsp16.3
<i>Pirellula</i> sp.	IbpB
<i>Pisum sativum</i> (pea)	Hsp18.1
<i>Plasmodium falciparum</i> 3D7	sHSPs
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA01	IbpA
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	IbpA
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Hsp26
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Typhi</i>	IbpA, IbpB
<i>Salmonella typhimurium</i> LT2	IbpA, IbpB
<i>Shewanella oneidensis</i> MR-1	IbpA
<i>Shigella flexneri</i> 2a str. 2457T	IbpA, IbpB
<i>Shigella flexneri</i> 2a str. 301	IbpA, IbpB
<i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021	IbpA
<i>Sinorhizobium meliloti</i> plasmid pSymA	IbpA
<i>Streptococcus pyogenes</i>	IbpA
<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	sHSPs
<i>Sulfolobus solfataricus</i>	sHSPs
<i>Synechococcus vulgaris</i>	Hsp16
<i>Thermoanaerobacter tengcongensis</i> strain MB4T	IbpA
<i>Thermoplasma acidophilum</i>	IbpA
<i>Yersinia pestis</i> KIM	sHSPs, IbpA, IbpB
<i>Yersinia pestis</i> strain C092	IbpA, IbpB

<20> 이에, 본 발명자들은 이차원 전기영동 시 단백질이 분해되는 것을 방지하기 위한 방법을 개발하고자 예의 노력한 결과, sHSPs가 단백질 분해 방지 효과를 가진다는 것을 처음으로 확

인함과 아울러, 이러한 sHSPs를 이용하여 이차원 전기영동을 수행할 경우, 훨씬 많은 단백질 스팟을 가진 젤을 얻을 수 있다는 것을 확인하고 본 발명을 완성하게 되었다.

#### 【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

- <21> 결국 본 발명의 주된 목적은 단백질 분해 방지용 조성물을 제공하는데 있다.
- <22> 본 발명의 다른 목적은 단백질의 분해를 방지하고 보다 많은 스팟을 가진 젤을 수득하기 위한 이차원 전기영동용 조성물을 제공하는데 있다.
- <23> 본 발명의 또 다른 목적은 단백질의 분해를 방지하고 보다 많은 스팟을 가진 젤을 수득하는 이차원 전기영동법을 제공하는데 있다.

#### 【발명의 구성 및 작용】

- <24> 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 작은 열 충격 단백질(sHSPs)을 유효량 함유하는 단백질 분해 방지용 조성물을 제공한다.
- <25> 본 발명은 또한, sHSPs를 유효량 함유하는 이차원 전기영동용 조성물을 제공한다.
- <26> 본 발명은 또한, sHSPs를 단백질 분해 방지제로 사용하는 방법을 제공한다.
- <27> 본 발명은 또한, 단백질 혼합물에 대한 이차원 전기영동법에 있어서, 상기 단백질 혼합물에 단백질의 분해를 방지하고 보다 많은 스팟을 가진 젤을 수득하기 위하여 sHSPs를 첨가한 다음 전기영동하는 것을 특징으로 하는 이차원 전기영동법을 제공한다.
- <28> 본 발명은 또한, 상기 조성물을 이용하는 것을 특징으로 하는 이차원 전기영동에 의한 프로테옴 분석방법을 제공한다.

<29> 본 발명에 있어서, 상기 sHSPs는 표 1에 기재된 단백질에서 선택된 어느 하나 이상인 것을 특징으로 할 수 있다.

<30> 본 발명에 있어서 이차원 전기영동법에 사용되는 단백질 혼합물은 특정 세포내 전체 단백질인 것을 특징으로 할 수 있고, 상기의 특정세포는 원핵세포(prokaryotes) 또는 진핵세포(eukaryotes)인 것을 특징으로 할 수 있으며, 상기의 원핵세포는 대장균 또는 슈도모나스(*Pseudomonas*) 속 미생물인 것을, 상기의 진핵세포는 인체(human)인 것을 특징으로 할 수 있다.

<31> 본 발명에 있어서, 단백질 분해 방지용으로 첨가되는 sHSPs의 양은 전기영동 시료의 전체단백질 100 중량부에 대하여 바람직하게는 0.1 내지 50중량부이고, 더욱 바람직하게는 0.5 내지 20중량부이다. 0.1이하의 중량부인 경우 단백질 분해 방지용으로써 절대양이 부족하며, 20이상의 중량부인 경우 과량의 sHSPs에 의해 분리하고자하는 특정세포의 단백질 분리를 방해하거나 sHSPs의 정제 비용측면에서 역 효과가 있는 문제점을 가지고 있다.

<32> 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

<33> 특히, 하기 실시예에서는 sHSPs로 대장균 유래의 IbpA 또는 IbpB, 슈도모나스(*Pseudomonas*) 유래의 IbpA 및 사카로마이시스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*) 유래의 HSP26을 예시하였으나, 표 1에 표기된 sHSPs 등도 제한 없이 적용될 수 있을 것이다.

<34> 실시예 1: *ibpA* 또는 *ibpB* 유전자를 함유하는 재조합 플라스미드의 제조

<35> 대장균 W3110(ATCC 39936)의 염색체 DNA, 슈도모나스 퓨티다(*Pseudomonas putida*) KT2440(ATCC 47054)의 염색체 DNA 및 사카로마이시스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*) 유래의 HSP26을 샘브룩(Sambrook) 등의 방법에 따라 분리 정제하였다 (Sambrook et al. Molecular Cloning, 2nd ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 1989). 대장균 W3110, 슈도모나스 퓨티다(*Pseudomonas putida*) KT2440 및 사카로마이시스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*)를 500mL의 LB 배지(Luria-Bertani medium)에서 24시간 동안 배양하였다. 균주들이 초기 대수 성장기에 있을 때 원심분리에 의하여 균체를 회수한 다음, 10mg/mL의 리소자임(lysozyme, Sigma Co., USA)이 포함되어 있는 TE 용액(10mM Tris, 1mM EDTA; pH 7.6) 50mL에 혼탁시켰다. 상기 균주 혼탁액을 24시간 동안 서서히 교반하면서 상온에서 배양하였다.

<36> 균주의 파쇄와 단백질 제거를 위하여, 상기 배양액에 10% SDS(sodium dodecyl sulfate) 용액 16mL과 20mg/mL의 프로테이즈 K(Proteinase K, Sigma Co., USA) 570 $\mu$ l를 첨가하고, 37°C에서 1시간 동안 반응하였다. 이어서, 5M 염화나트륨 용액 14mL과 0.7M 염화나트륨 용액에 용해되어 있는 10% CTAB(cetyltrimethylammoniumbromide, Sigma Co., USA) 10.66mL을 첨가한 다음, 65°C에서 10분간 반응시켰다. 그 다음, 상기 반응액과 같은 부피의 클로로포름-이소아밀알코올(chloroform:isoamylalcohol = 24:1)을 가하고, 상온에서 2시간 동안 조심스럽게 혼합하였다. 상기 혼합액을 6,000rpm으로 10분간 원심분리하여 상층액을 비이커에 옮겨 담고, 두 배 부피의 냉각된 에탄올을 천천히 가하여 염색체 DNA를 침전시킨 후, 유리봉으로 DNA를 말아서 감아 올렸다. 상기 유리봉을 자연 건조시켜 에탄올을 제거하고, 1mL TE 용액에 DNA를 용해시켰다. 상기 DNA 용액에 RNase(Sigma Co., USA)를 최종농도 50 $\mu$ g/mL이 되도록 가하고, 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 완료된 다음, 다시 상기 반응액과 같은

부피의 클로로포름-이소아밀알코올(chloroform:isoamylalcohol = 24:1)을 가하고, 상온에서 2시간 동안 조심스럽게 혼합하였다.

<37> 상기 혼합액을 6,000rpm으로 10분간 원심분리하여 상층액을 비아커에 옮겨 담고, 두 배 부피의 냉각된 에탄올을 천천히 가하여 염색체 DNA를 침전시킨 후, 유리봉으로 DNA를 말아서 감아 올렸다. 상기 유리봉을 자연 건조시켜 에탄올을 제거하고, 최종적으로 1mL TE 용액에 정제된 대장균 W3110, 슈도모나스 퓨티다(*Pseudomonas putida*) KT2440 및 사카로마이시스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*)의 염색체 DNA를 용해시켰다.

<38> IbpA, IbpB 또는 HSP26 단백질의 발현과 정제를 쉽게 하기 위하여 아래와 같이 재조합 플라스미드 pTac99IbpAH, pTac99IbpBH, pTac99<sub>PP</sub>IbpAH 및 pTac99HSP26H를 제작하였다. 대장균 W3110의 염색체 DNA를 주형으로 하고, 각각 서열번호 1과 2 및 서열번호 3와 4의 프라이머를 사용하여 PCR을 수행하여 대장균 유래의 *ibpA-6his*, *ibpB-6his* 유전자를 수득하였다. 또한, 슈도모나스 퓨티다(*Pseudomonas putida*) KT2440의 염색체 DNA를 주형으로 하고, 서열번호 5와 6의 프라이머를 사용하여 PCR을 수행하여 슈도모나스 유래의 *ppibpA-6his* 유전자를 수득하였다. 현재 슈도모나스 퓨티다(*Pseudomonas putida*) KT2440 지놈(genome)에서는 *ibpB* 유전자에 대해 밝혀지지 않았다. 사카로마이시스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*)의 염색체 DNA를 주형으로 하고, 서열번호 7와 8의 프라이머를 사용하여 PCR을 수행하여 사카로마이시스 세레비지에 유래의 HSP26-6his 유전자를 수득하였다. PCR에서, 첫 번째 변성(denaturation)은 95°C에서 5분간 1회 수행하였고, 이후 두 번째 변성은 95°C에서 50초간, 교접(annealing)은 55°C에서 1분간, 연장(extension)은 72°C에서 1분 30초간 수행하였으며, 이를 30회 반복하고, 이후 72°C에서 5분간 마지막 연장을 1회 수행하였다.

<39> 수득한 *ibpA-6his*, *ibpB-6his*, *ppibpA-6his* 및 *HSP26-6his* 유전자를 각각 *EcoRI*과 *HindIII*로 절단된 재조합 플라스미드 pTac99A에 삽입하여 각각 플라스미드 pTac99IbpAH, pTac99IbpBH, pTac99ppIbpAH 및 pTac99HSP26H를 제작하였다 (도 1, 도 2, 도 3 및 도 4). 재조합 플라스미드 pTac99A는 pTrc99A(Pharmacia Biotech., Uppsala, Sweden)의 *trc* 프로모터를 pKK223-3(Pharmacia Biotech., Uppsala, Sweden)의 *tac* 프로모터로 전환한 플라스미드로, pKK223-3의 *tac* 프로모터를 제한효소 *PvuII*와 *EcoRI*으로 얻은 다음 *tac* 프로모터 유전자 조각을 같은 제한효소로 절단된 pTrc99A에 삽입함으로써 제작하였다.

<40> 5'-ggaattcatgcgttaacttgatttatccccg-3'(서열번호 1)

<41> 5'-cccaagctttaatggtgatgatggtgatggttgattcgatacggcgcg-3'(서열번호 2)

<42> 5'-ggaattcatgcgttaacttcgatttatcccactg-3'(서열번호 3)

<43> 5'-cccaagctttaatggtgatgatggtgatggctattnaacgcggacgttcgct-3'(서열번호 4)

<44> 5'-ggaattcatgaccatgactactgcttc-3'(서열번호 5)

<45> 5'-cccaagctttaatggtgatgatggtgatggctcagcgctggtttt-3'(서열번호 6)

<46> 5'-ggaattcatgtcattaaacagtccattt-3'(서열번호 7)

<47> 5'-cccaagctttaatggtgatgatggtgatggttacccacgattcttgaga-3'(서열번호 8)

<48> 실시예 2: IbpA, IbpB 또는 HSP26 단백질의 정제

<49> 상기 실시예 1에서 제작된 IbpA, IbpB 또는 HSP26 단백질을 암호화하는 유전자를 포함하는 재조합 플라스미드 pTac99IbpAH, pTac99IbpBH, pTac99ppIbpAH 또는 pTac99HSP26H로 형질전

환된 재조합 대장균 XL1-Blue(Stratagene, USA)를 항생제 엠피실린(ampicillin, 50mg/L)이 첨가된 LB 배지(yeast extract 5g/L, tryptophan 10g/L, NaCl 10g/L)에 각각 배양하였다.

<50> IbpA, IbpB 또는 HSP26 단백질의 발현은 분광광도계로 600nm 파장에서 측정한 광학밀도(O.D.)가 0.7일 때 1mM의 IPTG(isopropyl- $\beta$ -thiogalactoside)를 첨가하여 줌으로써 유도하였다. 유도발현 후 4시간 경과한 다음에 배양액 1mL씩 채취하여 4°C에서 6000rpm으로 5분 동안 원심분리하여 얻은 침전물을 0.5mL TE 용액(Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM, pH 8.0)으로 한번 세척한 다음, 다시 4°C에서 6000rpm으로 5분 동안 원심분리하여 침전물을 수득하고, 이를 0.2mL 평형 용액(Urea 8M, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100mM, Tris 10mM, pH 8.0)에 혼탁하여 초음파 파쇄함으로써 분획하였다. 상기 혼탁 용액을 4°C에서 10,000rpm으로 10분 동안 원심분리하여 상동액을 수집하고 미리 평형 용액으로 평형화된 Ni-NTA spin column(Qiagen, USA)에 통과시킨 후, 2,000rpm으로 2분 동안 원심 분리하였다. 600 $\mu$ l 세척 용액(urea 8M, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100mM, Tris 10mM, pH 6.3)을 컬럼에 두 번 통과시키고 200 $\mu$ l 용리 용액(urea 8M, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100mM, Tris 10mM, pH 4.5)을 컬럼에 넣어 IbpA, IbpB 또는 HSP26 단백질을 정제하였다.

<51> 상기에서 정제된 IbpA, IbpB 또는 HSP26 단백질 함유 용액을 200 $\mu$ l씩 취하여 SDS-PAGE 샘플 용액(25% 글리세롤, 2% SDS, 14.4mM 2-머캅토에탄올, 0.1% 브로모페놀블루(bromophenol blue), 60mM Tris-HCl) 50 $\mu$ l와 혼합하고 10분간 끓인 다음, 이를 12% 분리용 젤(separating gel)에서 SDS-PAGE 젤 전기영동하였다. 이어, 젤을 염색 용액(메탄올 40%, 아세트산 10%, 0.25g/L 쿠마시 브릴리언트 블루 R(Coomassie brilliant blue R))에 2시간 이상 담가두어 염색하고, 다시 탈색 용액(40% 메탄올, 7% 아세트산)에 2시간 이상씩 두 번 담가두어 탈색하였다(도 5).

<52> 도 5는 각각의 재조합 플라스미드 pTac99IbpAH, pTac99IbpBH, pTac99<sub>PP</sub>IbpAH 또는 pTac99HSP26H로 형질전환된 재조합 대장균 XL1-Blue로부터 발현된 IbpA, IbpB 또는 HSP26 단백질을 정제한 전기영동 사진이다. 도 5(A)에서, 레인 M은 단백질 표준 분자량을 나타내며, 레인 1과 2는 정제된 IbpA, 레인 3과 4는 정제된 IbpB, 레인 5와 6은 정제된 pPIbpA를 나타낸다. 도 5(B)에서, 레인 M은 단백질 표준 분자량을 나타내며, 레인 1 내지 3은 정제된 HSP26을 나타낸다. 도 5에서 보듯이, 정제된 IbpA, IbpB 또는 HSP26 단백질의 순도(purity)가 거의 100%임을 알 수 있었다.

<53> 실시예 3: 프로테옴 연구를 위한 이차원 전기영동시 세포내에서의 IbpA 및/또는 IbpB의 효과

<54> 기존의 IbpA 및/또는 IbpB 발현 플라스미드 pACTacIbpA, pACTacIbpB 또는 pACTacIbpAB와 대조군인 플라스미드 p184ΔCm로 *ibpAB* 유전자가 제거된 돌연변이 대장균 WIB101(PCT/KR03/01371)에 각각 형질전환한 다음, 상기 실시예 2와 같은 방법으로 세포배양을 수행하였다. IbpA 및/또는 IbpB 단백질의 발현은 분광광도계로 600nm 파장에서 측정한 광학밀도(O.D.)가 0.7일 때 1mM의 IPTG(isopropyl-β-thiogalactoside)를 첨가하여 줌으로써 유도하였다. 유도발현 후 4시간 경과한 다음에 배양액 1mL씩을 채취하여 4°C에서 6000rpm으로 5분 동안 원심분리하여 얻은 침전물을 수득한 후 -20°C에 보관하였다. 각 형질전환된 대장균에 대한 이차원 전기영동을 아래와 같은 방법으로 수행하였다. 이차원 전기영동법은 2차원 공간에 단백질의 고유한 특성인 분자량과 전하량의 차이를 이용해서 세포 내 전체 단백질들을 펼쳐 보이는 방법이다 (Hochstrasser et al., Anal. Biochem., 173, 424-35, 1988; Han et al., J. Bacteriol. 183, 301-8, 2001).

<55> 본 실시예에서는 PROTEAN IEF cell과 PROTEAN II xi cell(Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA)을 이용하여 이차원 전기영동을 수행하였다. 이차원 전기영동을 위한 시료는 다음과 같이 처리하여 준비하였다. 세포배양액을 4°C에서 6000rpm으로 5분 동안 원심분리한 후 상층액을 버리고, 500μl의 저염 완충용액(KCl 3mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5mM, NaCl 68mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 9mM)으로 잔존 배지를 씻는다. 100μl 세포 용해 용액(cell lysis buffer; urea 8M, CHAPS 4%(w/v), DTT 65mM, Tris 40mM)에 혼탁한 후, 4°C에서 12,000 rpm으로 10분 동안 원심분리하여 전체 단백질을 수득하였다.

<56> 단백질은 Bradford 방법(Bradford MM, Anal. Biochem. 72, 248-254, 1976)을 사용하여 정량하였다. 단백질 200μg을 IEF 변성용액(urea 8M, CHAPS 0.5%(w/v), DTT 10mM, Bio-lyte pH 3-10 0.2%(w/v), Bromophenol Blue 0.001%(w/v)) 340μl에 녹여서 17cm ReadyStrip™ IPG Strips pH 3-10(Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA)에 넣어서 12시간 동안, 20°C에서 수화한 후 등전점 초점법(isoelectric focusing)을 수행하였다.

<57> 이후 스트립(strip)을 평형 완충용액 I(urea 6M, SDS 2%(w/v), Tris-HCl(pH 8.8) 0.375M, Glycerol 20%(v/v), DTT 130mM)에 약 15분간 진탕하면서 담근 다음, 다시 평형 완충용액 II(urea 6M, SDS 2%(w/v), Tris-HCl(pH 8.8) 0.375M, Glycerol 20%(v/v), Iodoacetamide 135mM, Bromophenol Blue 3.5M)에 약 15분간 진탕하면서 담근 후 스트립을 SDS-PAGE 젤에 올려서 분자량에 따른 분리를 수행하였다.

<58> 단백질은 은 염색 키트(silver staining kit; Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden)로 염색하였고, 이차원 젤은 GS710 Calibrated Imaging Densitometer(Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA)로 스캐닝 했으며, Melanie II(Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA) 소프트웨어로 젤 상의 단백질 수 또는 스팟 수(spot number)를 측정하였다 (도 6).

<59> 도 6은 시험관내(*in vivo*)에서 과량의 IbpA 및/또는 IbpB가 발현되는 형질전환된 대장균 WIB101의 이차원 전기영동 사진이다. 도 6에서, (A)는 대장균 WIB101(p184ΔCm), (B)는 대장균 WIB101(pACTacIbpA), (C)는 대장균 WIB101(pACTacIbpB), (D)는 대장균 WIB101(pACTacIbpAB)에 대한 이차원 전기영동 사진이다. 또한, 이차원 젤상에 원(circle)은 IbpA 및/또는 IbpB 단백질을 나타낸다.

<60> 도 6에서 보듯이, 대조군인 대장균 WIB101(p184ΔCm) 보다 IbpA 및/또는 IbpB 단백질이 과량으로 발현되는 형질전환된 대장균 WIB101(pACTacIbpA), WIB101(pACTacIbpB) 또는 WIB101(pACTacIbpAB)에서 많은 단백질 스팟을 가진 이차원 젤을 얻을 수 있었다.

<61> 따라서, 본 발명에서는 여러 다른 종(species)에서 유래된 sHSPs인 IbpA, IbpB 또는 HSP26을 이차원 전기영동용 조성물에 첨가하여 이차원 전기영동을 실시하였다.

<62> 실시예 4: 대장균 W3110의 이차원 전기영동시 IbpA 및/또는 IbpB의 효과

<63> 상기 실시예 3과 동일한 방법으로 대장균 W3110에 대한 이차원 전기영동을 수행하였다. 먼저, 정제된 IbpA 또는 IbpB 단백질 10 $\mu$ g에 대한 순도(purity)를 확인하기 위해 이차원 전기영동을 먼저 수행하였다 (도 7).

<64> 도 7은 정제된 IbpA와 IbpB 단백질의 이차원 전기영동 사진이다. 도 7에서, (A)는 IbpA이고, (B)는 IbpB의 이차원 전기영동사진이다. 도 7에서 보듯이, 이차원 전기영동 사진에서 IbpA 또는 IbpB 단백질을 제외하고 다른 단백질들은 거의 없음이 확인되었다. 따라서 IbpA 또는 IbpB의 순도는 거의 100%임을 알 수 있었다.

<65> sHSPs 효과를 확인하기 위해 정량화된 대장균 W3110 단백질 200 $\mu$ g에 IbpA, IbpB 또는 HSP26 단백질 10 $\mu$ g을 첨가하여 이차원 전기영동을 수행하였다 (도 8). 대조군으로는 정량화된 대장균 W3110 단백질 200 $\mu$ g을 사용하였다.

<66> 도 8은 대장균 W3110에 대한 이차원 전기영동 사진이다. 도 8에서 (A)는 대장균 W3110, (B)는 대장균 W3110에 10 $\mu$ g IbpA 단백질을 첨가한 경우, (C)는 대장균 W3110에 10 $\mu$ g IbpB 단백질을 첨가한 경우, (D) 대장균 W3110에 슈도모나스 유래의 10 $\mu$ g IbpA 단백질을 첨가한 경우, (E) 대장균 W3110에 사카로마이시스 세레비지 유래의 10 $\mu$ g HSP26 단백질을 첨가한 경우의 이차원 전기영동 사진이다. 도 8에서 보듯이, 기존의 방법에 비해 IbpA, IbpB 또는 HSP26 단백질이 첨가된 이차원 전기영동 사진에서는 많은 단백질 스팟이 나타나는 것을 확인할 수 있었다.

<67> 따라서, 본 발명이 다양한 범위의 프로테옴에 적용되는지를 확인하기 위해서, 대표적인 sHSPs인 IbpA로 원핵세포인 슈도모나스(*Pseudomonas*)와 진핵세포의 인체(Human)를 대상으로 이차원 전기영동을 실시하였다.

<68> 실시예 5: *Pseudomonas putida* KT2440의 이차원 전기영동시 IbpA의 효과

<69> 상기 실시예 3과 동일한 방법으로 슈도모나스 퓨티다(*Pseudomonas putida*) KT2440에 대한 이차원 전기영동을 수행하였다. IbpA 효과를 확인하기 위해 정량화된 슈도모나스 퓨티다(*Pseudomonas putida*) KT2440 단백질 200 $\mu$ g에 IbpA 단백질 10 $\mu$ g를 첨가하여 이차원 전기영동을 수행하였다 (도 9). 대조군으로는 정량화된 슈도모나스 퓨티다(*Pseudomonas putida*) KT2440 단백질 200 $\mu$ g를 사용하였다 (도 9).

<70> 도 9은 슈도모나스 퓨티다(*Pseudomonas putida*) KT2440에 대한 이차원 전기영동 사진이다. 도 9에서 (A)는 슈도모나스 퓨티다(*Pseudomonas putida*) KT2440, (B)는 슈도모나스 퓨티다(*Pseudomonas putida*) KT2440에 IbpA 단백질을  $10\mu\text{g}$  첨가한 경우의 이차원 전기영동 사진이다. 도 9에서 보듯이, IbpA 단백질이 첨가된 이차원 전기영동 사진에서는 훨씬 많은 단백질 스팟이 나타나는 것을 확인할 수 있었다.

#### <71> 실시예 6: Human serum의 이차원 전기영동시 IbpA의 효과

<72> 상기 실시예 3과 동일한 방법으로 인체 유래의 혈청(human serum)에 대한 이차원 전기영동을 수행하였다. IbpA 효과를 확인하기 위해 정량화된 인체 유래의 혈청 단백질  $200\mu\text{g}$ 에 IbpA 단백질  $10\mu\text{g}$ 를 첨가하여 이차원 전기영동을 수행하였다. 대조군으로는 정량화된 인체 유래의 혈청 단백질  $200\mu\text{g}$ 를 사용하였다 (도 10).

<73> 도 10은 인체 유래의 혈청에 대한 이차원 전기영동 사진이다. 도 10에서 (A)는 인체 유래의 혈청, (B)는 인체 유래의 혈청에 IbpA 단백질을  $10\mu\text{g}$  첨가한 경우의 이차원 전기영동 사진이다. 도 10에서 보듯이, IbpA 단백질이 첨가된 이차원 전기영동 사진에서는 훨씬 많은 단백질 스팟이 나타나는 것을 확인할 수 있었다.

#### 【발명의 효과】

<74> 본 발명은 열 충격 단백질(sHSPs)을 함유하는 단백질 분해 방지용 조성물 및 이차원 전기영동용 조성물을 제공하는 효과가 있다. 또한, IbpA, IbpB, IbpAB, HSP26 등 sHSPs를 이용한 본 발명에 따른 이차원 전기영동(two-dimensional gel electrophoresis) 방법에 의하면, 전기

영동시 단백질 스팟(spot)이 감소되는 것이 방지되어 훨씬 많은 단백질 스팟을 포함한 이차원 전기영동 사진을 얻을 수 있다. 따라서, 본 발명은 세포내 단백체 연구의 효율적 개선으로 혁신적인 기술을 제공하는 효과가 있다.

**【특허청구범위】****【청구항 1】**

작은 열 충격 단백질(small heat shock proteins; sHSPs)을 유효량 함유하는 단백질 분해 방지용 조성물.

**【청구항 2】**

제1항에 있어서, sHSP는 표 1에 기재된 단백질에서 선택된 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 단백질 분해 방지용 조성물.

**【청구항 3】**

sHSPs를 유효량 함유하는 이차원 전기영동용 조성물.

**【청구항 4】**

제3항에 있어서, sHSP는 표 1에 기재된 단백질에서 선택된 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 이차원 전기영동용 조성물.

**【청구항 5】**

IbpA, IbpB, IbpAB 및 HSP26으로 구성된 군에서 선택된 어느 하나를 유효량 함유하는 것을 특징으로 하는 단백질 분해 방지용 조성물.

**【청구항 6】**

제5항에 있어서, 단백질 혼합물의 이차원 전기영동시 단백질 분해 방지용인 것을 특징으로 하는 조성물.

**【청구항 7】**

단백질 혼합물에 대한 이차원 전기영동법에 있어서, 상기 단백질 혼합물에 단백질의 분해를 방지하고 보다 많은 스팟을 가진 젤을 수득하기 위하여 sHSPs를 첨가한 다음 전기영동하는 것을 특징으로 하는 이차원 전기영동법.

**【청구항 8】**

제7항에 있어서, sHSPs는 표 1에 기재된 단백질에서 선택된 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 이차원 전기영동법.

**【청구항 9】**

제8항에 있어서, sHSPs는 대장균 유래의 IbpA, IbpB 및 IbpAB와  
슈도모나스(*Pseudomonas*) 속 유래의 IbpA 및 사카로마이시스 세레비지에(*Saccharomyces*

*cerevisiae*) 유래의 HSP26으로 구성된 군에서 선택된 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 이차원 전기영동법.

#### 【청구항 10】

제7항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, sHSPs의 첨가량은 단백질 혼합물 100중량부에 대하여 0.1 내지 50중량부인 것을 특징으로 하는 이차원 전기영동법.

#### 【청구항 11】

제10항에 있어서, sHSPs의 첨가량은 단백질 혼합물 100중량부에 대하여 0.5 내지 20중량부인 것을 특징으로 하는 이차원 전기영동법.

#### 【청구항 12】

제7항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 단백질 혼합물은 특정 세포의 전체 단백질인 것을 특징으로 하는 이차원 전기영동법.

#### 【청구항 13】

제12항에 있어서, 특정세포는 원핵세포(prokaryotes) 또는 진핵세포(eukaryotes)인 것을 특징으로 하는 이차원 전기영동법.

**【청구항 14】**

제13항에 있어서, 원핵세포(prokaryotes)는 대장균 또는 슈도모나스(*Pseudomonas*) 속 미생물과 진핵세포(eukaryotes)는 인체(Human)인 것을 특징으로 하는 이차원 전기영동법.

**【청구항 15】**

이차원 전기영동에 의한 프로테옴 분석방법에 있어서, 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 조성물을 사용하는 것을 특징으로 하는 방법.

**【청구항 16】**

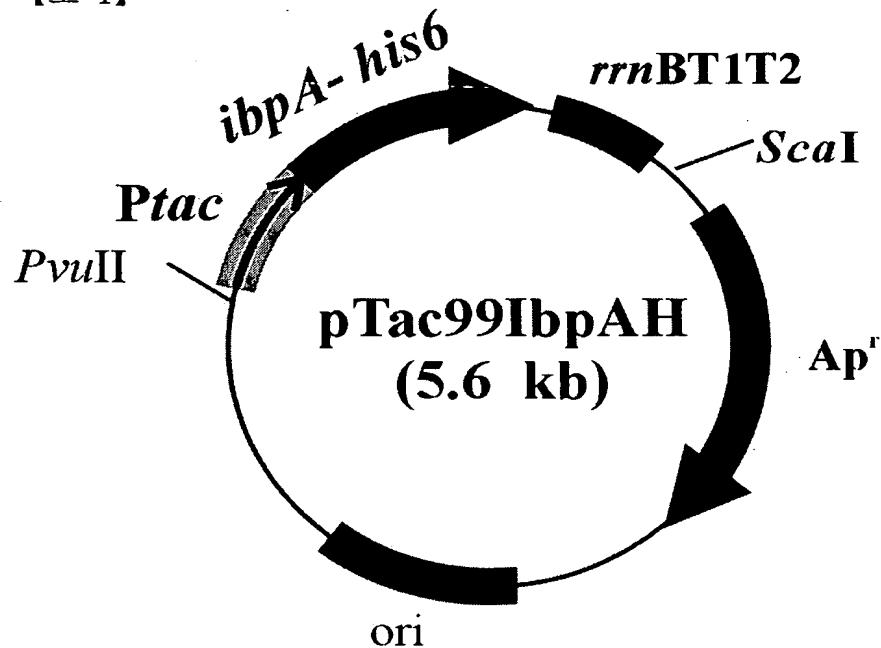
sHSPs를 단백질 분해 방지제로 사용하는 방법.

**【청구항 17】**

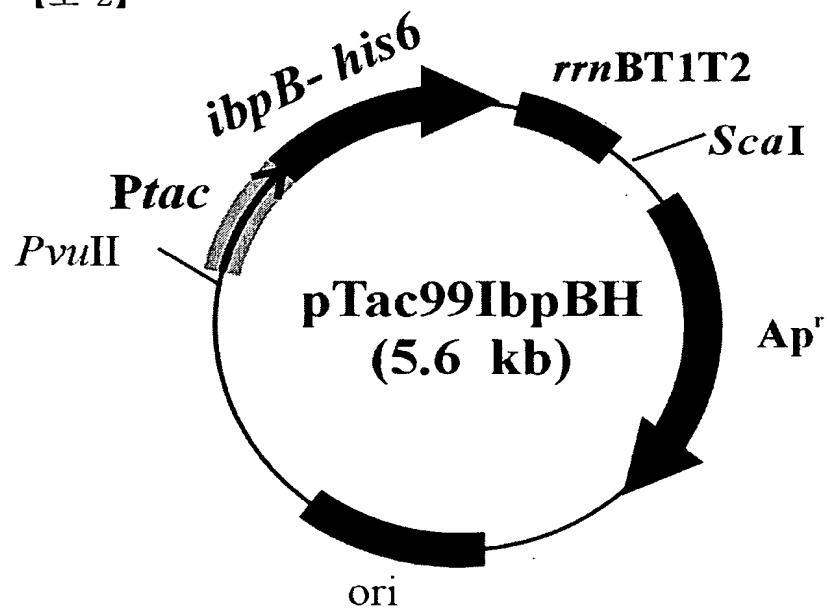
제16항에 있어서, sHSPs는 표 1에 기재된 단백질에서 선택된 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 방법.

## 【도면】

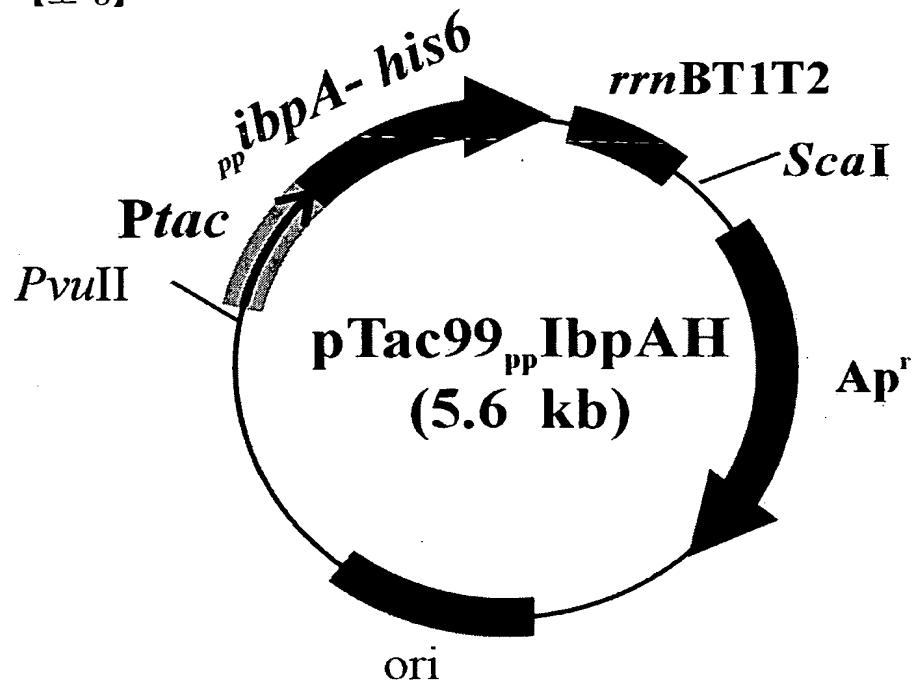
【도 1】



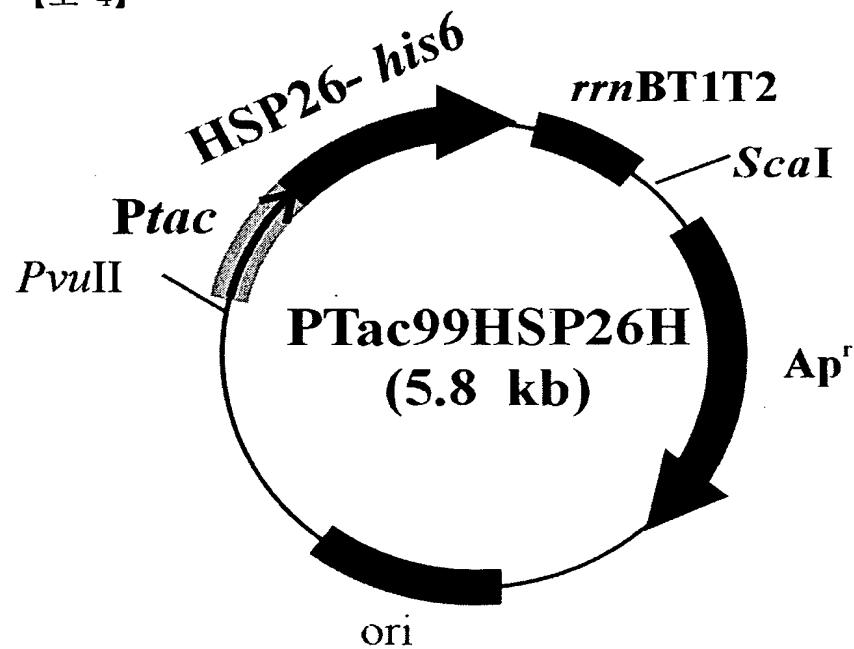
【도 2】

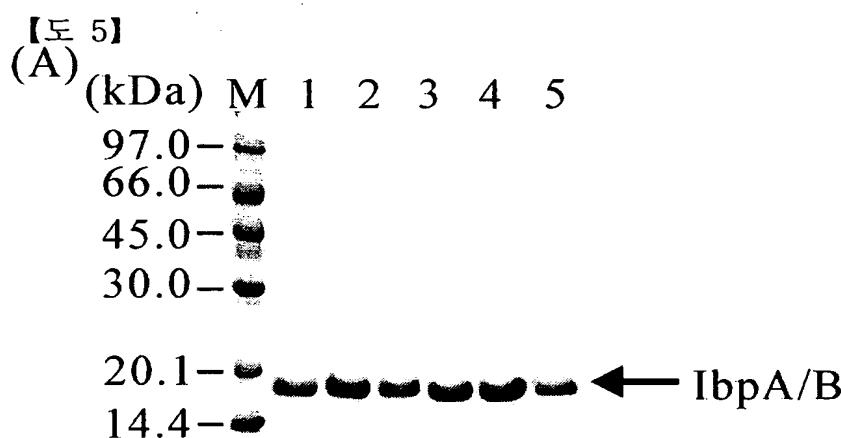


【도 3】



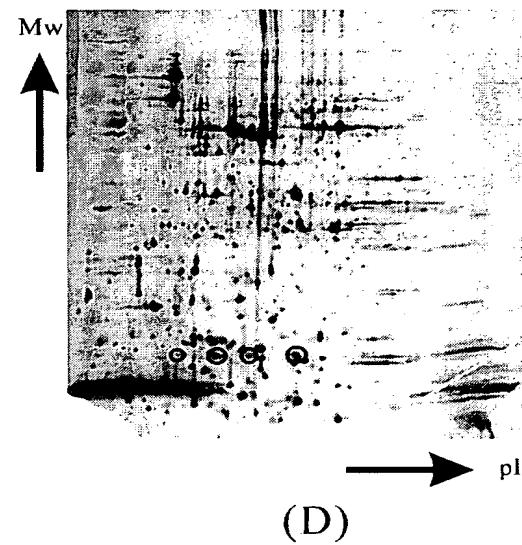
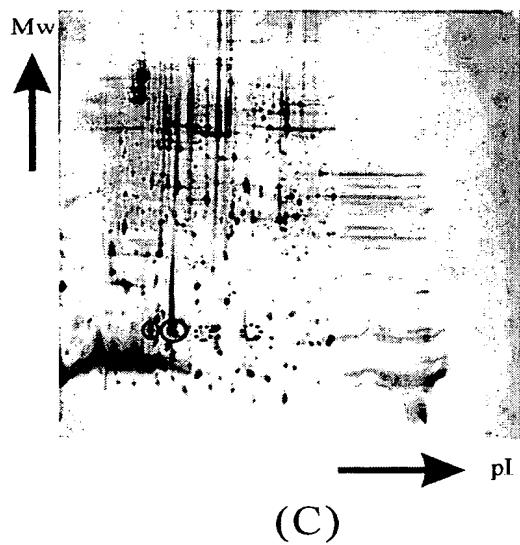
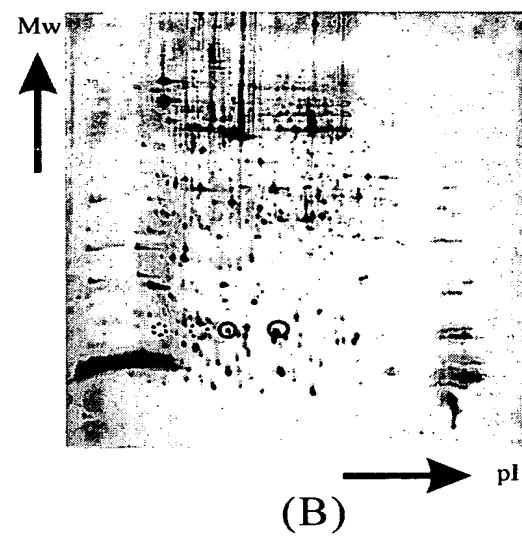
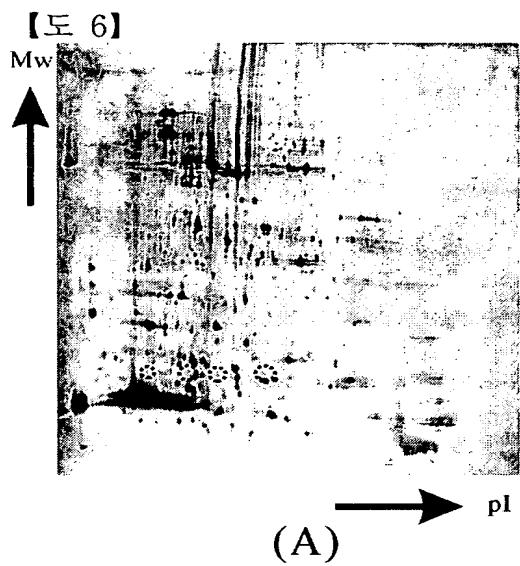
【도 4】





1020030062756

출력 일자: 2004/2/6

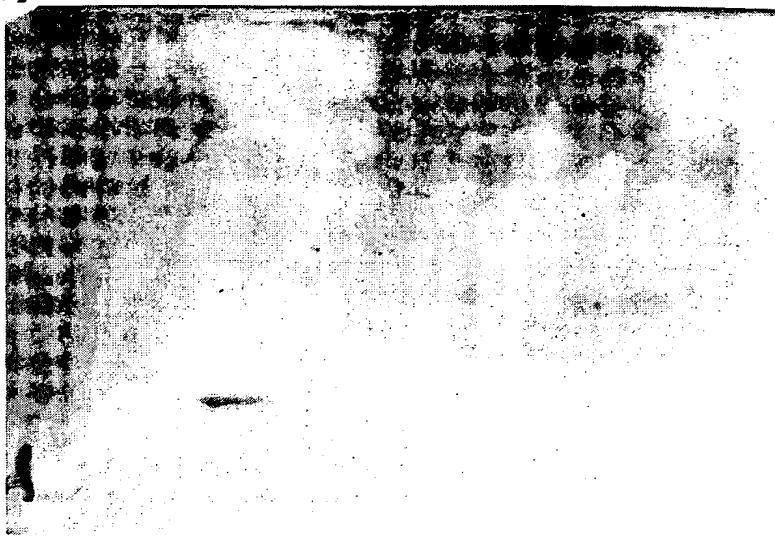


102030062756

출력 일자: 2004/2/6

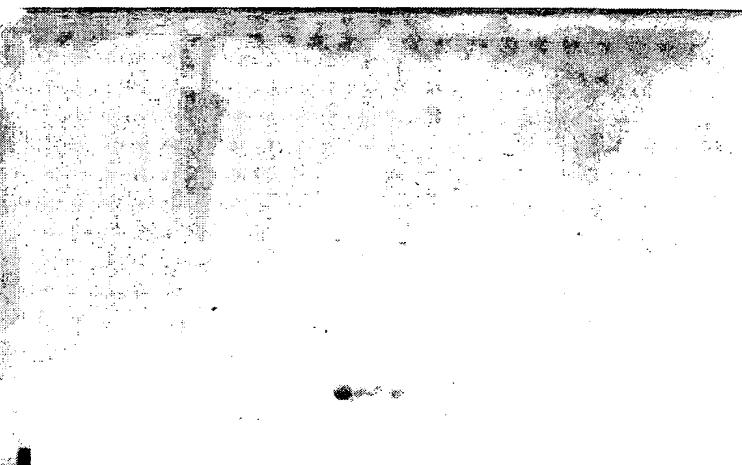
【도 7】

Mw



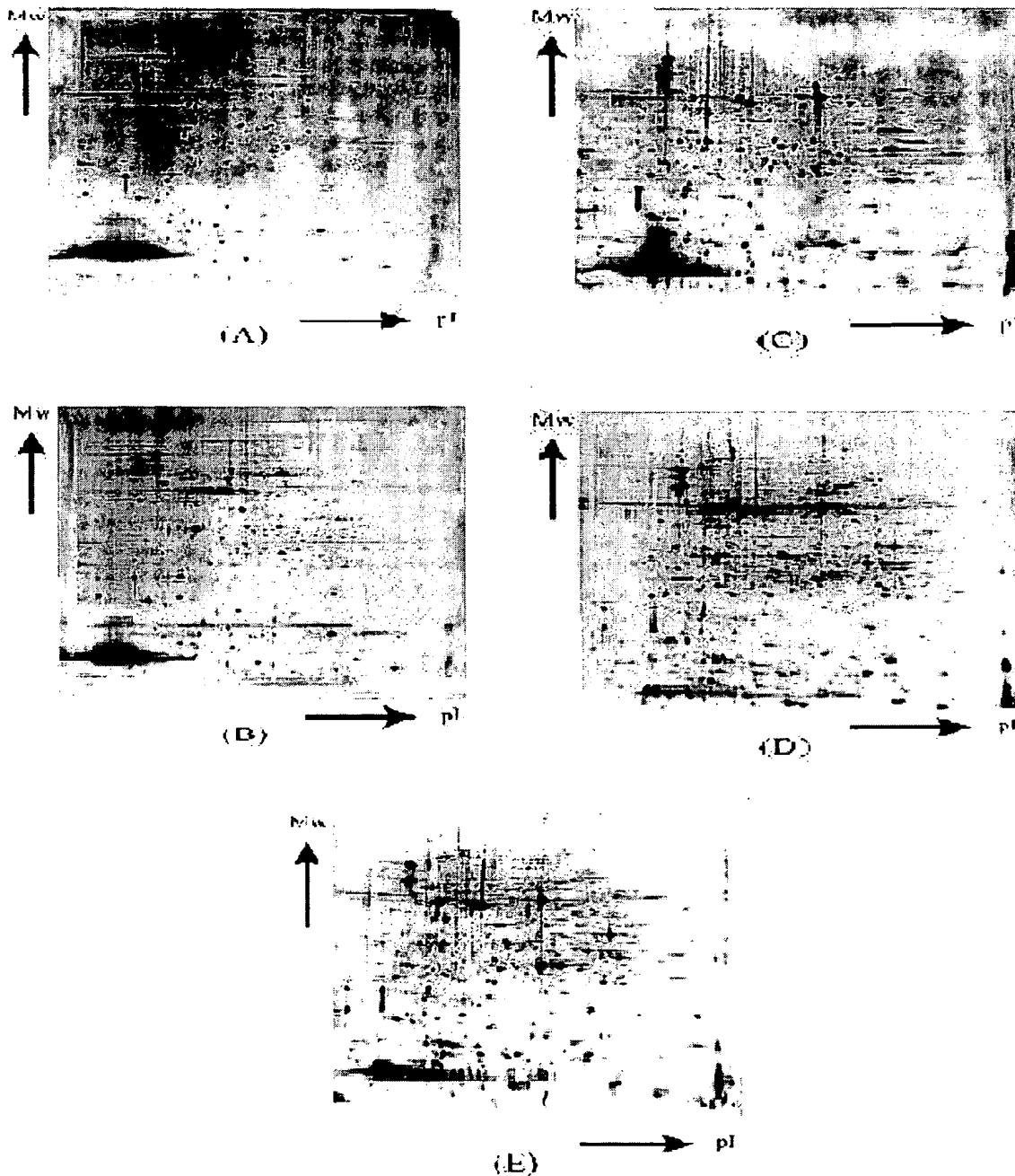
pI

Mw



pI

【도 8】

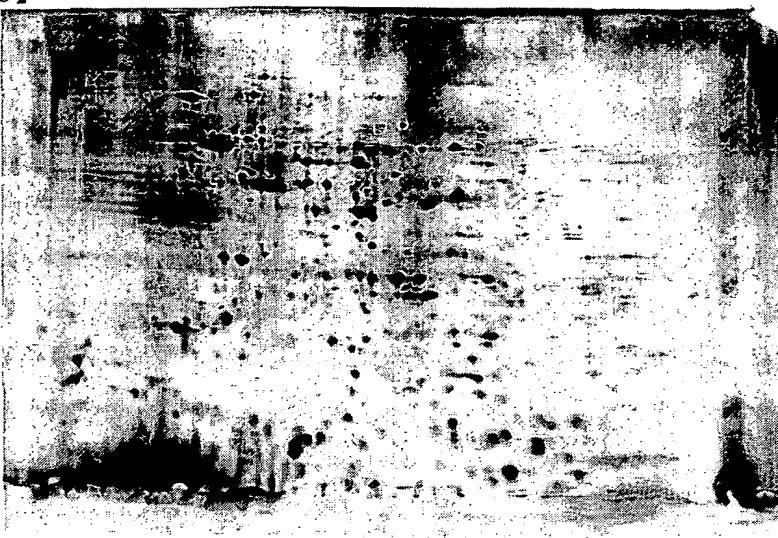


1020030062756

출력 일자: 2004/2/6

【도 9】

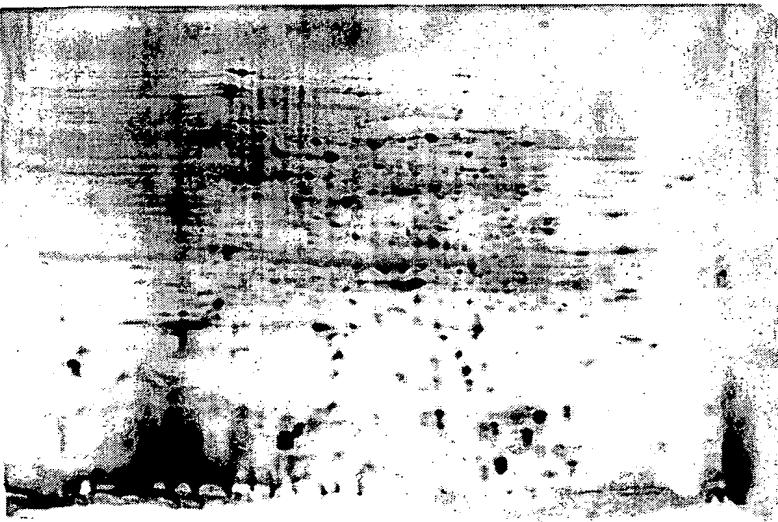
Mw



(A)

→ pI

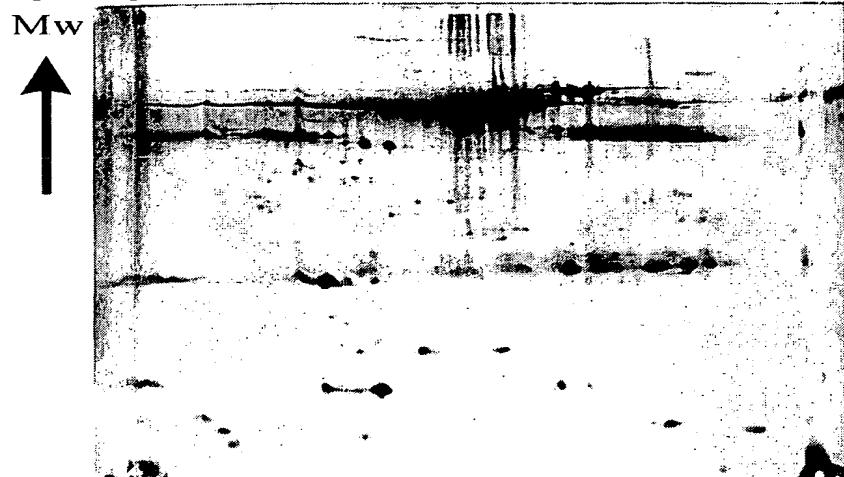
Mw



(B)

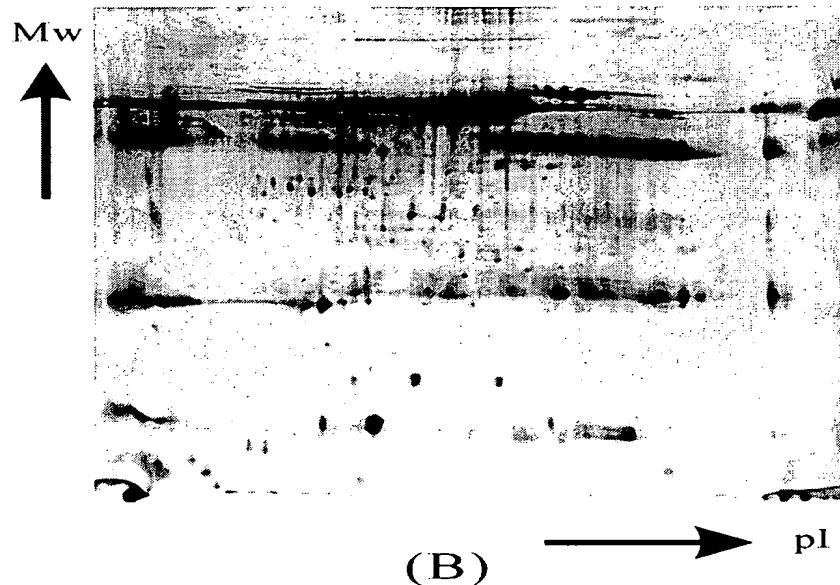
→ pI

【도 10】



Mw ↑

(A) → pl



## 【서열목록】

<110> Korea Advanced Institute of Science and Technology <120> Composition for Protecting a Protein  
Degradation Comprising Small Heat Shock Proteins(sHSPs) and Method of Two Dimensional Gel

Electrophoresis Using the shSPs <160> 8 <170> Kopatent In 1.71 <210> 1 <211> 31 <212> DNA <  
213> Artificial Sequence <220> <223> PCR primer <400> 1 ggaattcatg cgtaacttgc atttatcccc g  
31 <210> 2 <211> 51 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> PCR primer <400> 2  
cccaagcttt taatggtgat gatggtgatg gttgatttcg atacggcgcg g 51 <210> 3 <211> 34 <212>  
DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> PCR primer <400> 3 ggaattcatg cgtaacttgc atttatcccc ac  
34 <210> 4 <211> 53 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> PCR primer <400> 4  
cccaagctttt aatggtgatg atggtgatgg ctatthaacg cgggacgttc gct 53 <210> 5 <211> 28 <212>  
DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> PCR primer <400> 5 ggaattcatg accatgacta ctgctttc  
28 <210> 6 <211> 47 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> PCR primer <400> 6  
cccaagcttt taatggtgat gatggtgatg gttcagcgct ggaaaa 47 <210> 7 <211> 29 <212>  
DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> PCR Primer <400> 7 ggaattcatg tcatttaaca gtccatTTT  
29 <210> 8 <211> 51 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> PCR Primer <400> 8  
cccaagcttt taatggtgat gatggtgatg gttacccac gatttttag 51